

## PEMANFAATAN LIMBAH PENGOLAHAN AGAR SEBAGAI KOMPONEN MEDIUM PRODUKSI SELULASE DARI MIKROBA

### *The Use of Agar Processing Waste as A Component of Microbial Cellulase Producing Medium*

Yusro Nuri Fawzya<sup>1\*</sup>, Amelia Latifa<sup>2</sup>, dan Nita Noriko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan,  
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat, Indonesia

<sup>2</sup> Universitas Al-Azhar Indonesia, Indonesia

\* Korespondensi Penulis: nurifawzya@gmail.com

Diterima: 9 April 2014; Disetujui: 21 Mei 2014

#### ABSTRAK

Pengolahan agar dari rumput laut berkembang pesat di Indonesia. Hal ini berkaitan dengan produksi rumput laut yang cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Produksi yang meningkat ini diikuti dengan meningkatnya limbah pengolahan agar. Limbah ini diketahui memiliki kandungan selulosa yang tinggi. Pemanfaatan limbah ini umumnya untuk pembuatan pupuk dan komponen pakan. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah pengolahan agar sebagai komponen medium produksi enzim selulase dari mikroba. Tiga jenis isolat mikroba yaitu PMP1206, *Serratia marcescens* SGS 1609, dan isolat bakteri PC3, dikultivasi dalam medium padat yang mengandung karboksimetil selulosa (CMC). Isolat mikroba yang menghasilkan zona bening paling besar, dipilih dan enzim diproduksi dalam medium cair yang mengandung selulosa dari limbah agar. Enzim yang dihasilkan dari perlakuan terbaik dilakukan karakterisasi. Medium produksi enzim adalah medium sintetik minimal (MSM) cair dengan penambahan 1% limbah agar yang telah diberi perlakuan dengan NaOH 0, 2, 4, dan 6%. Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C, 150 rpm. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari untuk diuji aktivitas enzimnya. Hasil seleksi isolat menunjukkan bahwa *S. marcescens* SGS 1609 menghasilkan zona bening paling besar dengan indeks selulolitik 2,25. Produksi enzim selulase dari isolat ini pada medium limbah agar menunjukkan bahwa waktu optimal produksi enzim diperoleh pada inkubasi selama 1–3 hari dari perlakuan NaOH 6%. Enzim yang dihasilkan bekerja optimum pada pH 6 dan suhu 50 °C. Enzim bersifat stabil terhadap panas. Pada suhu 40–60 °C selama 4 jam penurunan aktivitas enzim tidak lebih dari 30%. Aktivitas selulase meningkat dengan penambahan ion Ca<sup>2+</sup> dan Mg<sup>2+</sup>, dan menurun dengan adanya 10 mM ion Zn<sup>2+</sup>.

**KATA KUNCI:** selulase mikroba, limbah pengolahan agar, perlakuan NaOH

#### ABSTRACT

Processing of agar from seaweeds has been growing rapidly in Indonesia. This is related to the seaweeds production which increases yearly. This production is followed with the increasing of agar processing waste. The waste is known having high cellulose content. It is commonly used for organic fertilizer as well as feed component. This research was purposed to utilize agar processing waste as production medium component of microbial cellulase. Three bacterial isolates, PMP1206, *Serratia marcescens* SGS 1609 and PC3 were cultivated in agar media containing carboxymethylcellulose (CMC). The isolate producing the largest clear zone, was selected and enzyme was produced in liquid medium containing cellulose from agar processing waste. The enzyme product from the best treatment was characterized. The medium for enzyme production was liquid Minimal Synthetic Media (MSM) added with 1% agar waste which had been treated with NaOH 0, 2, 4 and 6%. Incubation was conducted at 30 °C, 150 rpm. Sampling was carried out daily to determine enzyme activity. The result showed that *S. marcescens* SGS 1609 produced the largest clear zone with the cellulolytic index of 2.25. The production of *S. marcescens* SGS 1609 cellulase in medium containing cellulose from agar processing waste indicated that the optimum production time was 1–3 days using NaOH 6% treatment. The enzyme worked optimally at 50 °C pH 6 and was stabil against heat. Incubation the enzyme at 40–60°C for 4 hours decreased the activity not more than 30%. The cellulase activity increased by the addition of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, and decreased by the addition of 10 mM ion Zn<sup>2+</sup>.

**KEYWORDS:** microbial cellulase, agar processing waste, NaOH treatment

## PENDAHULUAN

Rumput laut merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia yang menghasilkan devisa negara dari hasil ekspornya. Produksi budidaya rumput laut terus meningkat, rata-rata sebesar 29% per tahun; dan pada tahun 2013 mencapai 8,2 juta ton, dengan nilai total ekspor sebesar US\$162,5 juta (Global Energi, 2014). Salah satu pemanfaatan rumput laut adalah untuk pengolahan agar. Kim *et al.* (2007) menyatakan bahwa ekstraksi agar dari rumput laut menghasilkan limbah sekitar 65–75%. Limbah agar ini mengandung selulosa cukup tinggi, yaitu 27,38–39,45% (Fithriani *et al.*, 2007).

Meningkatnya produksi rumput laut Indonesia mengakibatkan hasil samping pengolahan rumput laut juga meningkat. Pemanfaatan limbah pengolahan rumput laut, termasuk pengolahan agar sampai saat ini terbatas pada penggunaan untuk komponen pakan dan pupuk. Limbah pengolahan agar kaya akan selulosa, sehingga memungkinkan untuk digunakan sebagai substrat bagi mikroba-mikroba pendegradasi selulosa, seperti yang dilaporkan oleh Hariadi (2001) yang memanfaatkan limbah agar sebagai media penghasil produk biomassa mikroorganisme. Tingginya kadar selulosa di dalam limbah agar berpotensi juga sebagai sumber bioetanol yang merupakan energi terbarukan. Hidrolisis selulosa dalam limbah agar dapat dilakukan secara biologi maupun cara kimia. Proses hidrolisis secara biologi melibatkan enzim selulase yang mampu mendegradasi selulosa.

Enzim selulase merupakan salah satu enzim yang permintaannya cukup tinggi. Enzim ini semakin banyak dibutuhkan dengan meningkatnya produksi bioetanol dari bahan berselulosa. Salah satu penghasil enzim selulase adalah mikroorganisme seperti kapang *Trichoderma*, *Humicola*, dan *Aspergillus* (Sukumaran *et al.*, 2005, Kuhad *et al.*, 2011). Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan memiliki koleksi isolat bakteri penghasil enzim potensial, diantaranya adalah isolat bakteri SGS 1609 yang diisolasi dari rumput laut *Sargassum* sp., PMP1206 dari rumput laut *Gracilaria* sp. dan PC3 dari sumber air panas. Isolat bakteri SGS 1609 dan PMP1206 diketahui bersifat selulolitik (Munifah *et al.*, 2011), dan isolat bakteri SGS 1609 telah teridentifikasi sebagai *Serratia marcescens*. Penelitian bertujuan untuk (1) melakukan seleksi terhadap ketiga isolat sebagai penghasil enzim selulase, (2) memanfaatkan limbah pengolahan agar, sebagai komponen media produksi enzim selulase dari isolat terpilih, dan (3) melakukan karakterisasi enzim yang dihasilkan dari perlakuan terbaik untuk mengetahui kondisi optimum bekerjanya enzim tersebut.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri PMP1206, *S. marcescens* SGS 1609, dan isolat bakteri PC3, limbah industri pengolahan agar yang diperoleh dari salah satu industri pengolahan agar di Tangerang, Jawa Barat, dan NaOH untuk *pretreatment* limbah. Selain itu digunakan bahan-bahan kimia untuk pengujian aktivitas enzim dan karakterisasi enzim, serta bahan-bahan media/mikrobiologi untuk kultivasi bakteri.

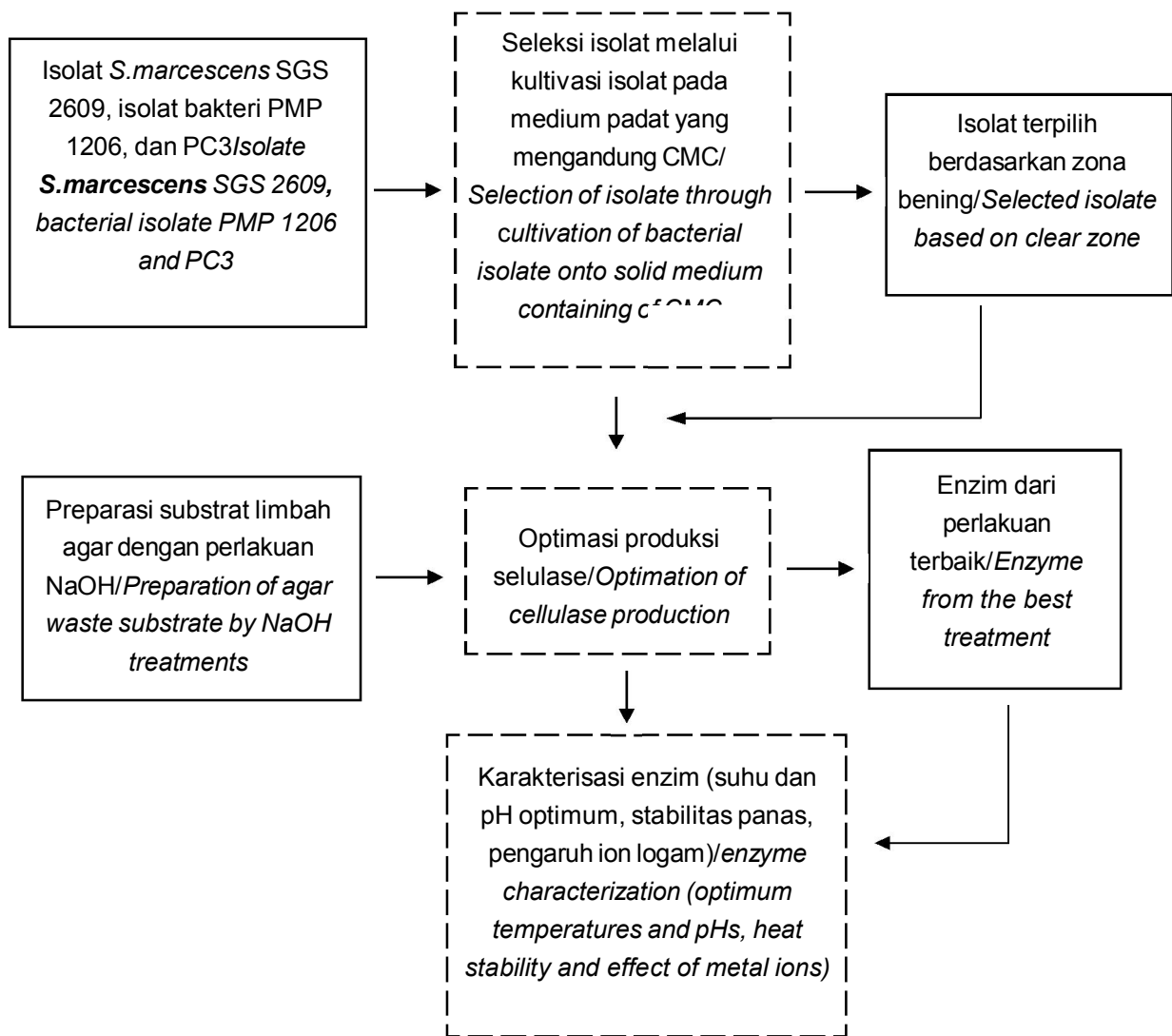
### Metode

Penelitian dilakukan secara bertahap, diawali dengan seleksi isolat bakteri yang didasarkan atas kemampuannya menghasilkan enzim selulase pada media CMC padat, ditunjukkan oleh zona bening yang dihasilkan. Isolat bakteri terpilih kemudian ditumbuhkan pada medium cair yang mengandung limbah agar yang telah mengalami *pretreatment*. *Pretreatment* dilakukan menggunakan NaOH dengan 4 variasi konsentrasi 0, 2, 4, dan 6%. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel, sebanyak 3 kali ulangan; kemudian sampel disentrifugasi. Filtrat sebagai enzim kasar, diuji aktivitas enzimnya. Enzim yang dihasilkan dari kondisi optimum kemudian dilakukan karakterisasi, meliputi pengaruh suhu dan pH, ketahanan panas dan pengaruh ion logam. Secara garis besar, penelitian ini dilakukan mengikuti diagram alir yang disajikan pada Gambar 1.

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif dan analisis statistik. Analisis deskriptif dilakukan terhadap seleksi isolat bakteri selulolitik dan karakterisasi enzim, berdasarkan pengamatan dan kurva atau histogram hasil pengolahan data aktivitas enzim. Analisis statistik dilakukan pada penentuan perlakuan konsentrasi NaOH terbaik terhadap aktivitas enzim, menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan faktor konsentrasi NaOH, dan inkubasi sebagai kelompok. Data diolah menggunakan Program SPSS versi 19. Perlakuan yang berbeda nyata dilanjutnya dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Duncan.

### Seleksi isolat bakteri selulolitik

Seleksi isolat bakteri selulolitik didasarkan atas uji kualitatif aktivitas selulase melalui pengamatan terhadap zona bening. Uji kualitatif dilakukan dengan metode pewarnaan merah kongo 0,1% (Ponnambalam *et al.*, 2011). Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu menghasilkan enzim selulase. Secara



Gambar 1. Diagram alir produksi enzim selulase menggunakan medium yang mengandung limbah agar.  
 Figure 1. Flow chart of cellulase production using medium containing of agar waste.

kualitatif, besarnya aktivitas selulase ini dinyatakan sebagai Indeks selulolitik atau indeks aktivitas selulase (IAS), diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Kader & Omar 1998) :

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{A - B}{B}$$

Keterangan/Note:

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

#### Preparasi limbah pengolahan agar

Preparasi limbah pengolahan agar dilakukan 2 tahap, yaitu menghilangkan sisa agar yang masih terkandung dalam limbah dan diberi pretreatment

dengan penambahan NaOH. Menghilangkan agar dilakukan dengan menambahkan air mendidih ke dalam limbah dengan perbandingan 1:20, kemudian didiamkan selama 1 jam, lalu dicuci hingga pH netral dan disaring. Limbah pengolahan agar selanjutnya dikeringkan dengan cara dijemur. Limbah kering kemudian diberi pretreatment/delignifikasi mengikuti metode Gunam *et al.* (2010) dengan penambahan NaOH dengan konsentrasi 0, 2, 4, dan 6%, kemudian dipanaskan pada suhu 121 °C selama 15 menit. Campuran kemudian disaring, dicuci dengan air sampai netral (pH 7) disiapkan untuk komponen media kultur bakteri penghasil enzim lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105 °C selama 10 jam. Limbah agar siap diaplikasikan sebagai substrat untuk produksi enzim selulase.

**Produksi enzim selulase**

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara mengkultivasi isolat bakteri terpilih pada media yang mengandung limbah agar yang telah diberi perlakuan NaOH. Starter dibuat dengan cara menginokulasikan kultur segar ke dalam medium cair yang mengandung MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05%; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,002%, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,004%; yeast extract 0,2%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,03%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% dan CMC 1%. Selanjutnya starter dipindahkan ke dalam media produksi sebanyak 20% dari volume media produksi dengan komposisi media sama dengan media starter, kecuali CMC diganti dengan limbah pengolahan agar yang telah mengalami perlakuan. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C, 150 rpm selama 6 hari. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel, disentrifugasi pada 9000 x g, 4°C selama 10 menit dan filtrat sebagai enzim kasar diuji aktivitasnya dengan metode Miller yang dimodifikasi (Wood & Saddler 1988). Enzim yang dihasilkan dari perlakuan terbaik, yaitu yang memberikan aktivitas enzim tertinggi, kemudian dilakukan karakterisasi enzim.

**Karakterisasi enzim**

Karakterisasi enzim dilakukan untuk menentukan pH dan suhu optimum enzim serta pengaruh ion-ion

logam terhadap aktivitas enzim. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji dengan mereaksikan enzim dengan substrat pada berbagai pH (3–9), dengan menggunakan 0,05 M bufer asetat (pH 3, 4, dan 5); 0,05 M bufer sitrat fosfat (pH 5, 6, dan 7); dan 0,05 M bufer tris-HCl (pH 7, 8, dan 9). Penentuan suhu optimum dilakukan dengan mereaksikan enzim dengan substrat pada pH optimum dan berbagai suhu (30–90°C). Pengaruh ion logam diamati terhadap ion-ion logam bivalen (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) dan trivalen (Fe<sup>3+</sup>) yang ditambahkan dalam bentuk garam khlorida dengan konsentrasi 5 dan 10 mM. Aktivitas enzim selulase diukur sesuai dengan prosedur pengujian sebelumnya.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

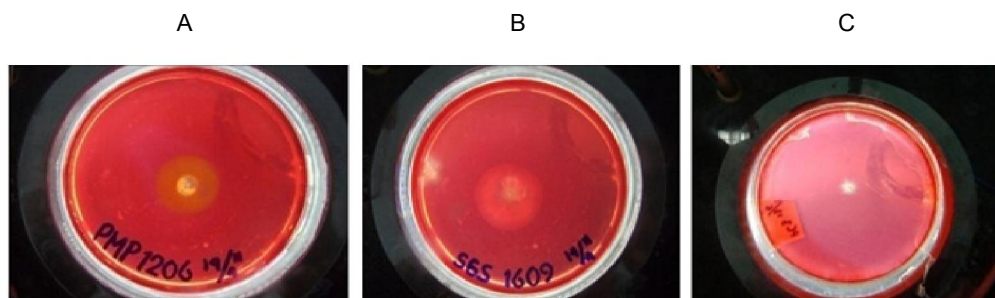
**Seleksi Isolat Bakteri Selulolitik**

Dari 3 isolat bakteri yang diuji kemampuannya dalam menghasilkan selulase secara kualitatif, diperoleh hasil bahwa isolat *S.marcescens* SGS 1609 menghasilkan indeks selulolitik terbesar (IS = 2,25), dibandingkan 2 isolat lainnya (Tabel 1 dan Gambar 2). Pewarna *congo red* akan diserap oleh polisakarida yang memiliki ikatan α-D-glukan. Terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa polisakarida telah

Tabel 1. Nilai Indeks Selulolitik dari isolat bakteri PMP1206, *S. marcescens* SGS 1609, dan isolat bakteri PC3 pada medium CMC

Table 1. Cellulolytic Index Values of bacterial isolates PMP1206, *S. marcescens* SGS 1609, dan bacterial isolate PC3

| Isolat/Isolate                | Diameter Zona Bening/<br>Clear Zone Diameter<br>(mm) | Diameter Koloni/<br>Colony Diameter<br>(mm) | Indeks Selulolitik/<br>Cellulolytic index |
|-------------------------------|--|---|---|
| PMP1206                       | 25   | 9   | 1.78                                      |
| <i>S. marcescens</i> SGS 1609 | 39   | 12  | 2.25                                      |
| PC3                           | 5  | 3   | 0.67                                      |



Gambar 2. Zona bening isolat PMP 1206 (A), *S.marcescens* SGS 1609 (B), dan PC3 pada medium CMC (C).  
Figure 2. Clear zone of isolate PMP 1206 (A), *S. marcescens* SGS 1609 (B) and PC3 (C).

Tabel 2. Hasil perlakuan NaOH pada limbah pengolahan agar  
 Table 2. Result of NaOH treatment on agar processing waste

| Parameter                      | Konsentrasi NaOH/NaOH Concentration (%) |   |                                      |                                      |
|--------------------------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                | 0                                       | 2                                       | 4                                    | 6                                    |
| Warna/Colour                   | Hitam<br>Kecoklatan/<br>Brown/Black     | Coklat Keabu-<br>abuan/Greyish<br>Brown | Abu-abu<br>Kehitaman/<br>Blacky Grey | Abu-abu<br>Kehitaman/<br>Blacky Grey |
| Rendemen/Yield (%)             | 33.5                                    | 24.8                                    | 25.5                                 | 23.9                                 |
| Kadar Air/Moisture Content (%) | 5.6                                     | 5.6                                     | 5.4                                  | 5.2                                  |
| Kadar Abu/Ash Content (%)      | 6.4                                     | 6.4                                     | 6.3                                  | 6.0                                  |

terdegradasi menjadi sakarida dengan rantai yang lebih pendek sehingga tidak dapat menyerap pewarna *congo red* (Zhang et al., 2006). Dengan demikian ketiga isolat yang digunakan memang memiliki kemampuan mendegradasi selulosa dari limbah agar, yang memiliki ikatan  $\alpha$ -D-glukan. Berdasarkan hasil kualitatif ini maka isolat *S.marcescens* SGS 1609 diteliti lebih lanjut untuk dikultivasi pada medium yang mengandung limbah agar, guna mendapatkan informasi karakter enzimnya.

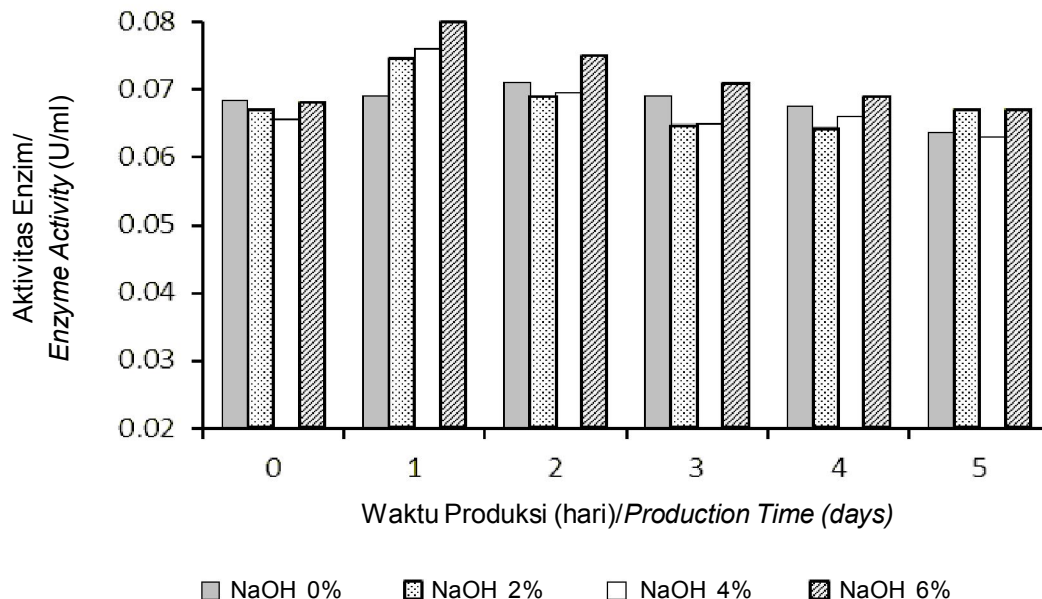
**Preparasi Limbah Pengolahan Agar**

Penghilangan sisa agar dari limbah pengolahan agar menghasilkan rendemen berupa limbah yang lebih bersih dari pengotor sebesar 33,5%. Selanjutnya perlakuan pemanasan dengan larutan NaOH menghasilkan rendemen yang lebih rendah, berkisar

antara 23,9-25,5% dan sedikit penurunan kadar abu dari 6,4% menjadi 6,0% pada penggunaan NaOH konsentrasi 6% (Tabel 2). Kadar abu yang tinggi pada limbah pengolahan agar diduga berasal dari *celite* yang mengandung silika (Si) yang digunakan dalam proses penyaringan pada pengolahan agar di industri. Semakin tinggi konsentrasi NaOH juga menghasilkan kenampakan limbah yang lebih baik, yaitu lebih pucat (keabu-abuan) dari yang semula berwarna coklat kehitaman. Dengan demikian NaOH berkontribusi terhadap pengurangan mineral dan pigmen.

**Produksi Selulase *S. marcescens* SGS 1609**

Aktivitas enzim selulase yang diproduksi dengan menggunakan medium yang mengandung selulosa dari limbah pengolahan agar disajikan pada Gambar 3. Hasil uji statistik (Anova) menunjukkan bahwa baik



Gambar 3. Aktivitas selulase *S. marcescens* SGS 1609 yang dihasilkan dari substrat yang mengalami pretreatment dengan berbagai konsentrasi NaOH.

Figure 3. *S. marcescens* SGS 1609 cellulase activity produced by substrates pretreating with various concentration of NaOH.

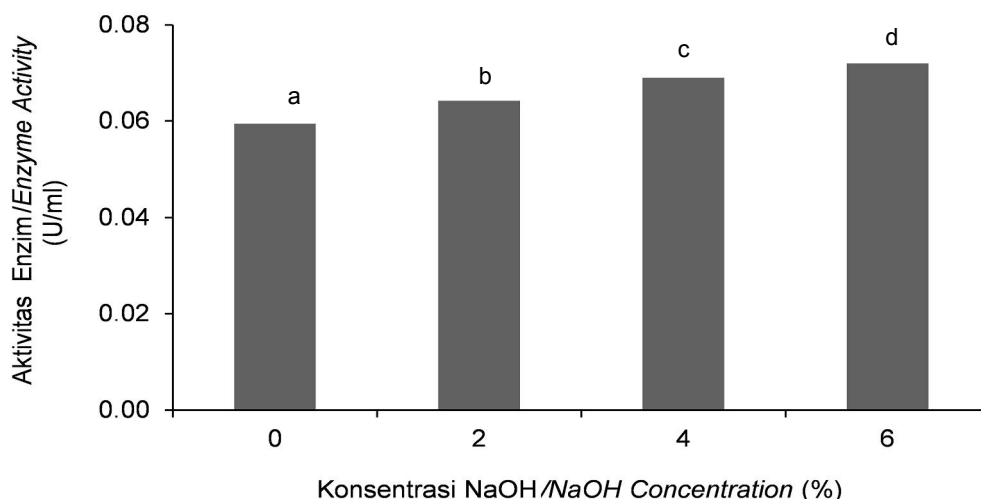
konsentrasi NaOH maupun waktu produksi menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda nyata (Gambar 4 dan 5). Limbah pengolahan agar yang mengalami *pretreatment* NaOH dengan konsentrasi yang lebih tinggi menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi. Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan dari perlakuan konsentrasi NaOH 6%. Waktu produksi, meskipun memberikan pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) namun hasil uji BNT menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang diproduksi selama 1 hari, yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, tidak berbeda nyata dengan 2 dan 3 hari.

Menurut Yi-Zheng *et al.* (2009), perlakuan dengan alkali pada dasarnya adalah proses delignifikasi. Dinyatakan bahwa mekanisme proses ini merupakan saponifikasi ikatan ester intermolekuler pada ikatan silang antara xilan hemiselulosa dengan komponen lain seperti lignin dan hemiselulosa yang lain. Perlakuan alkali juga menghilangkan asetil dan berbagai substitusi asam uronat pada hemiselulosa yang dapat mengurangi akses enzim terhadap selulosa dan hemiselulosa (Chang *et al.*, 2000). Fan *et al.* di dalam Yi-Zheng *et al.* (2009), menyatakan bahwa perlakuan alkali pada bahan lignoselulosa menyebabkan longgarnya struktur selulosa, meningkatkan luas permukaan, rusaknya struktur lignin dan terpisahnya ikatan struktural antara lignin dengan karbohidrat. Pemisahan/isolasi selulosa dari limbah agar menggunakan NaOH juga dilaporkan oleh Nurhayati *et al.* (2014) yang mempelajari sintesis selulosa asetat dari limbah pengolahan agar. Dilaporkan bahwa konsentrasi NaOH 6% menghasilkan kadar selulosa yang paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 3 dan 9%. Terkait dengan hal ini, maka NaOH dengan konsentrasi 6% telah cukup untuk memberikan perlakuan pada limbah

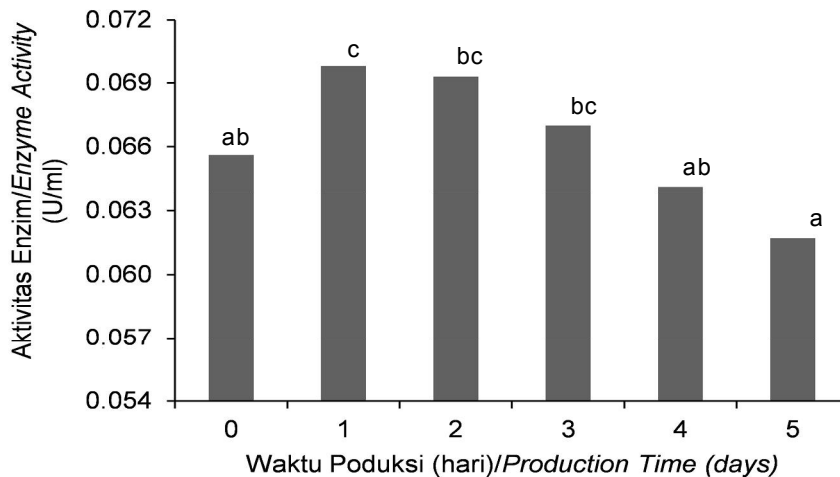
agar guna menumbuhkan mikroba penghasil enzim selulase.

Rata-rata aktivitas enzim selulase *S.marscescens* SGS 1609 yang dihasilkan dari perlakuan NaOH berkisar antara 0,06–0,07 U/ml (Gambar 4). Terjadi peningkatan aktivitas enzim sekitar 16,7% dengan adanya perlakuan NaOH 6% dibandingkan kontrol. Meskipun berbeda nyata, namun nilai ini relatif rendah. Limbah agar yang berasal dari industri mengandung mineral cukup tinggi, mengurangi akses enzim untuk bereaksi dengan selulosa. Fawzya *et al.* (2013) melakukan pengujian aktivitas enzim selulase *S.marscescens* SGS 1609 pada berbagai substrat, dan mendapatkan bahwa substrat limbah agar dari industri yang mendapat perlakuan NaOH 6% menghasilkan aktivitas enzim yang lebih rendah (0,087 U/ml) dibanding limbah agar dari pengolah tradisional yang sama-sama mendapat perlakuan NaOH 6% (0,134). Limbah agar dari pengolah tradisional yang dalam prosesnya tidak menggunakan celite lebih mudah dalam proses delignifikasi oleh NaOH, sehingga substrat yang dapat diakses oleh enzim lebih banyak.

Gunam *et al.* (2010) melaporkan bahwa perlakuan NaOH 6% pada jerami padi dapat meningkatkan aktivitas enzim endoglukanase dari 0,0271 menjadi 0,0365 U/ml atau meningkat sekitar 34,6%. Efektivitas perlakuan NaOH untuk delignifikasi dipengaruhi oleh kondisi substrat maupun perlakuannya. Menurut Bjerre *et al.* (1996) dalam Yi-Zheng *et al.* (2009), perlakuan alkali lebih efektif untuk delignifikasi bahan berselulosa dari jenis *hardwood*, tanaman herba dan limbah pertanian yang umumnya mengandung lignin tidak terlalu tinggi. Kandungan lignoselulosa pada rumput laut dilaporkan sekitar 3-4% (Santi *et al.*, 2012); sedangkan Chasanah *et al.* (2010) menemukan bahwa kandungan lignin pada rumput laut *Gracilaria*



Gambar 4. Pengaruh berbagai konsentrasi NaOH terhadap aktivitas enzim selulase.  
 Figure 4. Effect of various NaOH on the cellulase activity.



Gambar 5. Pengaruh waktu produksi terhadap aktivitas enzim selulase *S. marcescens* SGS 1609 menggunakan medium limbah agar  
 Figure 5. Effect of production time on the cellulase activity of *S. marcescens* SGS 1609 in agar waste medium

mencapai sekitar 12%. Menurut Milled *et al.* (1976) dalam Yi-Zheng *et al.* (2009), kemampuan enzim mendegradasi kayu keras yang diberi perlakuan NaOH bisa meningkat sekitar 14–55%

Perlakuan alkali untuk delignifikasi bahan berselulosa umumnya lebih sering digunakan dibandingkan dengan perlakuan menggunakan asam kuat seperti asam sulfat atau asam klorida. Hal ini disebabkan adanya beberapa kelemahan penggunaan asam kuat, seperti bersifat korosif, menghasilkan produk degradasi yang menghambat fermentasi biomassa alami, diperlukan penanganan/pembuangan garam-garam hasil penetralan terhadap sisa asam dan perlunya penanganan reduksi partikel biomassa (Yi-Zheng *et al.*, 2009).

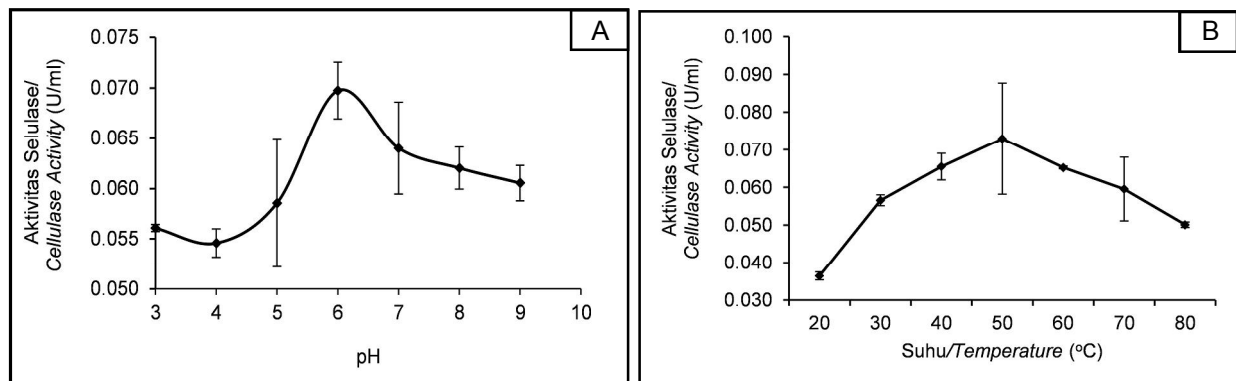
Waktu optimum produksi selulase *S. marcescens* SGS 1609 dengan menggunakan medium yang mengandung limbah agar adalah 1–3 hari (Gambar

5). Hasil serupa dilaporkan oleh Sudto *et al.* (2008) yang menggunakan beberapa jenis limbah pertanian sebagai substrat untuk produksi selulase dari *Bacillus subtilis*, *E. coli* dan *Rhizobium* sp. Aktivitas selulase tertinggi dihasilkan pada inkubasi selama 20 jam.

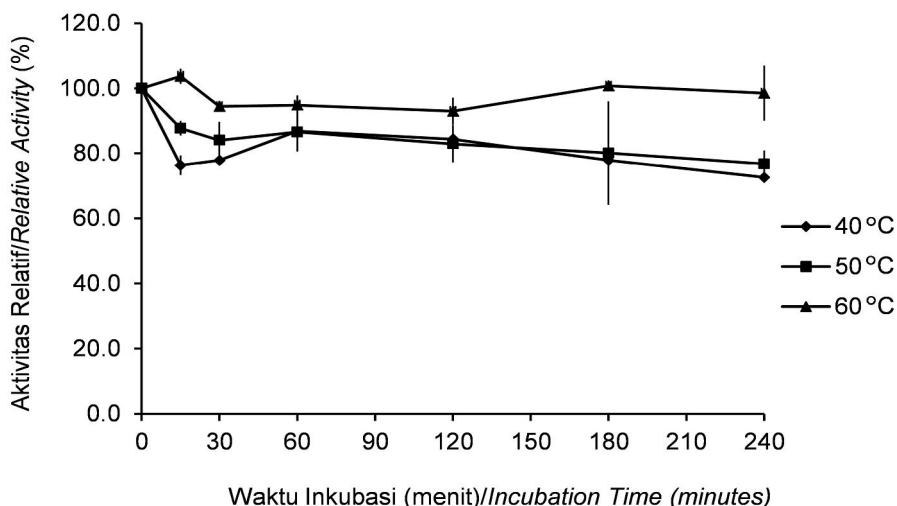
Acharya dan Chaudhary (2011) menemukan bahwa waktu optimum produksi selulase dari *Bacillus licheniformis* WBS1 dan *Bacillus* sp. WBS3 dalam medium cair yang mengandung jerami padi dan jerami gandum adalah 60 jam. Produksi selulase dari kapang *Aspergillus niger* menggunakan medium yang mengandung jerami padi memerlukan waktu lebih lama yaitu sampai dengan 5 hari (Jadhav *et al.*, 2013).

### Karakterisasi Enzim Selulase

Hasil karakterisasi enzim menunjukkan bahwa enzim selulase *S. marcescens* SGS 1609 bekerja optimal pada pH 6 dan suhu 50 °C (Gambar 6).



Gambar 6. Pengaruh pH (A) dan suhu (B) terhadap aktivitas enzim selulase *S. marcescens* SGS 1609.  
 Figure 6. Effect of pH (A) and temperature (B) on the cellulase activity of *S. marcescens* SGS 1609.

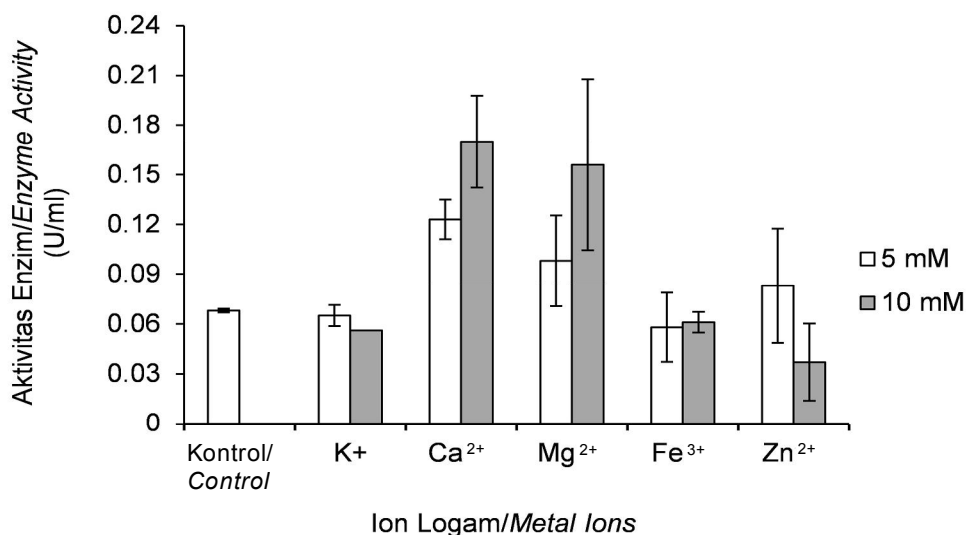


Gambar 7. Stabilitas panas enzim selulase *S. marcescens* SGS 1609.  
 Figure 7. Heat stability of *S. marcescens* SGS 1609 cellulase.

Dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu selulase dari *S.marcescens* SGS 1609 yang diproduksi dalam medium cair mengandung CMC sebagai substrat (Fawzya *et al.*, 2013) pH optimum enzim sedikit bergeser dari 7 menjadi 6, sedangkan suhu optimum enzim sama, yaitu 50 °C. Optimasi pada suhu 40–60°C pada penelitian ini ditinjau dari nilai aktivitas enzim dan standar deviasinya masih berada dalam kisaran yang sama, sehingga dapat dikatakan enzim bekerja optimum pada kisaran suhu 40–60 °C. Beberapa selulase mikroba memiliki pH dan suhu optimum yang hampir sama dengan hasil penelitian ini, seperti selulase *Streptomyces ruber* yang memiliki pH dan suhu optimum 6 dan 40 °C

(Nermeen *et al.*, 2010), dan selulase *Pseudomonas* sp. yang bekerja optimum pada suhu 40 °C (Gautam *et al.*, 2010). Selulase mikroba lain yang bekerja optimal pada pH 6 adalah selulase *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin *et al.*, 2010), dan selulase *Bacillus* sp. yang diisolasi dari sawah (Vijayaraghavan & Vincent, 2012).

Hasil pengujian stabilitas enzim terhadap panas menunjukkan bahwa enzim selulase *S.marcescens* SGS 1609 relatif stabil pada suhu 40–60 °C (Gambar 7). Selama 4 jam enzim yang diinkubasi pada kisaran suhu tersebut hanya mengalami penurunan aktivitas enzim tidak lebih dari 30%; bahkan pada suhu 60 °C, aktivitas enzim masih mencapai sekitar 90%. Pola serupa ditemukan pada enzim dari mikroba yang



Gambar 8. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas selulase *S.marcescens* SGS 1609.  
 Figure 8. Effect of metal ions on the cellulase activity of *S.marcescens* SGS 1609.



sama tetapi diproduksi menggunakan medium yang berbeda, yaitu dengan substrat karboksimetil selulosa. Pada substrat ini, penurunan aktivitas enzim tidak lebih dari 20% (Fawzya et al., 2013). Enzim yang stabil terhadap panas sangat diminati oleh berbagai industri. Selulase yang stabil terhadap panas sangat berguna dalam proses sakarifikasi bahan-bahan berserat yang umumnya memerlukan waktu cukup panjang untuk proses hidrolisisnya (Nigam, 2013). Salah satu faktor yang berperan terhadap ketahanan panas enzim adalah banyaknya ikatan disulfida dalam molekul protein enzim (Pons et al., 1995).

Karakteristik selulase *S. marcescens* SGS 1609 terkait dengan pengaruhnya terhadap berbagai ion logam menunjukkan bahwa ion kalsium merupakan aktivator sehingga adanya ion kalsium akan meningkatkan aktivitas enzim cukup signifikan, demikian juga ion  $Mg^{2+}$ . Diantara ion-ion logam yang diamati pengaruhnya, hanya ion  $Zn^{2+}$  pada konsentrasi 10 mM yang bersifat menghambat aktivitas enzim sekitar 40% (Gambar 8).

## KESIMPULAN

*Serratia marcescens* SGS 1609 mempunyai aktivitas selulolitik terbesar berdasarkan pembentukan zona bening dibandingkan dengan isolat PMP1206 dan PC3. Pemanfaatan limbah pengolahan agar untuk media produksi enzim selulase dari mikroba sebaiknya didahului dengan perlakuan terhadap limbah tersebut. Penggunaan 1% limbah pengolahan agar yang diberi perlakuan NaOH 6% dalam medium MSM cair menghasilkan enzim selulase dari *S. marcescens* SGS 1609 dengan aktivitas paling tinggi dibandingkan perlakuan NaOH 0; 2; dan 4%. Waktu optimal produksi enzim selulase *S. marcescens* SGS 1609 dalam medium tersebut adalah 1–3 hari. Enzim selulase yang dihasilkan bekerja optimum pada pH 6, suhu 50 °C, dan stabil pada suhu 40–60 °C selama 4 jam. Enzim dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan penambahan ion kalsium dan magnesium pada konsentrasi 5–10 mM.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis sampaikan kepada Ifah Munifah dan Dewi S. Zilda yang telah menyediakan isolat bakteri untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Acharya, S. & Chaudhar, A. (2011). Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring.

*Journal of Scientific & Industrial Research*. 70: 142–148.

Chang, V. & Holtzapple, M. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*. 84/86: 5–37.

Chasanah, E., Fawzya, Y.N., Poernomo, A., Munifah, I., Dewi, A.S., Pratitis, A. & Patantis, G. (2010). *Penelitian Pemanfaatan Mikroorganisme dan Enzim untuk Pengembangan Produk Berbasis Surimi Tropical Catfish, Bioenergi dari Limbah Rumput Laut, dan Nutrasetikal dari Limbah Udang*. Laporan Teknis. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

Fawzya, Y.N., Putri, S., Noriko, N. & Patantis, G. (2013). Identification of SGS 1609 cellulolytic bacteria isolated from *Sargassum spec.* and characterization of the cellulase produced. *Squalen, Bulletin Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 8(2): 57–68.

Fithriani, D., Rodiah, N., & Bakti, B.S. (2007). *Ekstraksi selulosa dari limbah pembuatan karaginan*. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2(2): 91–97.

Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Jamaluddin, Awasthi, M.K., & Sarsaiya, S. (2010). Cellulase production by *Pseudomonas sp.* isolated from municipal solid waste compost. *International Journal of Academic Research*. 2(6): 330–333. <http://www.ijar.lit.az>

Global Energi. (2014). LPEI : Rumput Laut : Produk Ekspor Unggulan. [http://www.global-energi.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1829:lpei-rumput-laut-produk-ekspor-unggulan&catid=61:industri&Itemid=87](http://www.global-energi.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1829:lpei-rumput-laut-produk-ekspor-unggulan&catid=61:industri&Itemid=87)

Gunam, I.B.M, Buda Ketut, & Guna, M.Y.S.I. (2010). Effect of delignification with NaOH solution and rice straw substrat concentration on production of cellulase enzyme from *Aspergillus niger* NRRL A-II. 264. *Jurnal Biologi XIV*. (1): 55–61.

Hariadi, R. (2001). *Mempelajari Pemanfaatan Limbah Pengolahan Agar-Agar Kertas sebagai Media Penghasil Produk Biomassa Mikroorganisme dengan Menggunakan Ragi Roti dan Ragi Tempe*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. 41 pp.

Jadhav, A.R., Girde A.V., More S.M., More S.B., & Saiqua Khan. (2013). Cellulase Production by Utilizing Agricultural Wastes. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(7): 6–9.

Kader, A.J. & Omar, O. (1998). Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah. Serawak. *J Biodiversity Bio-Conserv (ARBEC)*. p. 1–6.

Kim, G.S., Myung, K.S., Kim, Y.J., Oh, K.K., Kim, J.S., Ryu H.J., & Kim, K.H. (2007). *Method of Producing Biofuel Using Sea Algae*. Seoul: World Intellectual Property Organization

Kuhad, R.C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research Volume 2011*, Article ID 280696, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/280696>. Diakses pada bulan November 2013.

- Munifah, I., Chasanah, E., & Fawzya, Y.N. (2011). Screening of cellulolytic microbes from Indonesia's marine environment. Paper presented on International Seminar of Indonesian Society for Microbiology (ISISM) and IUMS-Outreach Program on Food Safety at Bali, 22–24 Juni 2011.
- Nermeen A. El-Sersy, N.A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G.M., Ibrahim, H.A.H., & El-Toukhy, N.M.K. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*. 9(38): 6355–6364
- Nigam, P.S. (2013). Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. Review. *Biomolecules*. 3: 597–611; doi:10.3390/biom3030597
- Nurhayati & Rinta Kusumawati. (2014). Sintesis selulosa asetat dari limbah pengolahan agar. Dalam proses penerbitan *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*.
- Pons, J., Planas, A., & Querol, E. (1995). Contribution of a disulfide bridge to the stability of 1,3-1,4-P-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Protein Eng*. 8: 939–945.
- Ponnambalam, A.S., Deepthi, R.S., and Ghosh, A.R. (2011). Qualitative display and measurement of enzyme activity of isolated cellulolytic bacteria. Research Article, *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*. 2011. 1(1): 33–37.
- Santi, R.A., Sunarti, T.C., Santoso, D., & Triwisari, D.A. 2012. Komposisi kimia dan profil polisakarida rumput laut hijau. *J. Akuatika* III (2): 105–114.
- Sudto, A., Punyathiti, Y., & Pongsilp, N. (2008). The use of agricultural wastes as substrates for cell growth and carboxymethyl cellulase (CMCase) production by *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* AND *Rhizobium* sp. *KMITL Sci. Tech. J.* 8(2): 84
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., & Pandhey, A.S. (2005). Microbial cellulases: Production, applications and challenges. *J. of Scientific and Industrial Research*. 64: 832–844.
- Vijayaraghavan, P. and Vincent, S.G.P. (2012). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase of *Bacillus* sp. isolated from a paddy field. *Polish journal of Microbiology*. 61(1): 51–55.
- Wood, T.M. & Saddler, J.N. (1988). Increasing the availability of cellulose in biomass materials. In Wood, W.A. and Kellog, J.A. (eds.). *Methods in Enzymology Cellulose and Hemicellulose*. Volume ke-160. New York: Academic press. p. 3–11.
- Yin, Li-Jung, Lin, Hsin-Hung & Xiao, Zheng-Rong. (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3): 466-471. <http://jmst.ntou.edu.tw/marine/18-3/466-471.pdf>. Diakses pada bulan April 2012.
- Yi-Zheng, Zhongli Pan, & Ruihong Zhang. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng*. 2(3): 51–68. DOI: 10.3965/j.issn.1934-6344.2009.03.051-068
- Zhang Y.H.P, Himmel M.E., & Mielenz J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. 24: 452–481.